1. NOME DO TESTE

- A hemoglobina glicada é também chamada de hemoglobina glicosilada, hemoglobina A1c ou simplesmente, HbA1c.

2. APLICAÇÃO CLÍNICA

- Hemoglobina Glicada, também abreviada como Hb A1c, é uma forma de hemoglobina presente naturalmente nos eritrócitos humanos que é útil na identificação de altos níveis de glicémia durante períodos prolongados. Este tipo de hemoglobina é formada a partir de reacções não enzimáticas entre a hemoglobina e a glucose. Quanto maior a exposição da hemoglobina a concentrações elevadas de glucose no sangue, maior é a formação dessa hemoglobina glicada. Como esta reacção é irreversível, a hemoglobina glicada permite identificar a concentração média de glicose no sangue durante períodos longos de tempo, ignorando alterações de concentração episódicas. Isto é útil no diagnóstico de diabetes, mesmo que o doente se abstenha de consumir produtos com glucose dias antes da consulta, de forma a esconder a sua situação ou a incorrecta ingestão de alimentos, tendo em conta a sua condição. Também se evita assim que certos factores que alteram a concentração de glucose do sangue por curtos períodos (como por exemplo, o stress) possam indicar um falso diagnóstico.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

- O programa do BIORAD D-10 Hemoglobina A1C utiliza o principio da cromatografia líquida de alta performance (HPLC). As amostras são automaticamente diluídas no aparelho e injetadas na coluna analítica. O D-10 utiliza um programado de gradiente de concentração que aumenta a força iônica para a coluna, onde as hemoglobinas são separadas baseadas em suas interações iônicas com o material da coluna. As frações da hemoglobina passam pelo filtro do fotômetro e as mudanças são mensuradas na absorbância em 415 nm.

4. AMOSTRA

- Tipos de amostra: Usar sangue total coletado com EDTA.
- Armazenamento e estabilidade da amostra: Até duas semanas se conservado em geladeira. Se conservado em freezer, a estabilidade é de 3 meses
- Critérios para rejeição da amostra: Presença de coágulos.

4.1 PREPARAÇÃO DOS PRIMERS, CALIBRADORES, CONTROLES E AMOSTRAS.

- **Primer (Sangue Total):**

Reconstituir com 1 mL de água destilada.

Aguardar 10 minutos; Homogeneizar gentilmente.

Estável por 1 dia a 2-8ºC.

É passado uma vez por coluna.

- **Calibradores:**

Composto de dois níveis.

Reconstituir com 7 mL do diluente calibrador.

Aguardar de 5-10 minutos; Homegeneizar gentilmente.

Estável por 7 dias a 2-8ºC.

Adicionar 1mL no microtubo de 1.5mL;

É feito uma vez por coluna.

- **Controles:**

Reconstituir com 0,5mL de água destilada.

Aguardar 10 minutos; Homogeneizar gentilmente.

Estável por 7 dias a 2 a 8ºC.

Diluir 1:300 por análise (10µL de controle com 3mL de wash);

Passar os controles uma vez por dia.

- **Amostras:**

Não necessitam de pré-diluição, a menos que o volume da amostra seja menor que 2mL.

Se for o caso, pré-dilua a amostra a 1:300 no microtubo de 1,5mL (10µL de controle com 3mL de wash).

As amostras devem ser coletadas em tubos de vácuo contendo EDTA.

5. MATERIAIS REQUERIDOS

Equipamento da hemoglobina glicada.

6. REAGENTES

- **Tampão de Eluição 1:** Dois frascos contendo 2L de Bis-Tris/tampão fosfato, pH 6,0. Contém <0,05% azida sódica como conservante. **Pronto para uso.**
- **Tampão de Eluição 2:** Um frasco contendo 1L de Bis/Tristampão fosfato, pH 6,7. Contém < 0,05% de azida sódica como conservante. **Pronto para uso.**
- **Solução de Wash/Diluente:** Um frasco contendo 1,6L de água deionizada com < 0,05% de azida sódica como conservante. **Pronto para uso.**
- **Coluna analítica:** Uma coluna analítica, 4.0mm ID x 30mm.
- **Disquete:** Com parâmetros para o programa D-10 hemoglobina A_{1C}.
- **Calibrador/Diluente:** Um conjunto contendo 3 fracos de calibradores nível e 3 frascos de calibrador nível 2 e e um frasco com diluente de calibrador.
- **Primer:** 4 frascos de hemolisado de células vermelhas liofilizados com gentamicina, tobramicina e EDTA como conservantes.

- **Frascos de amostras:** 100 frascos de 1,5mL.
- **Papel térmico:** Um rolo.

6.1 PREPARO DE REAGENTES

a) Instalar novos Tampões e o Wash

Coloque o sistema em Sleep;

Remova os reagentes um de cada vez;

Não toque ou seque os “pescadores”.

Coloque cada garrafa de tampão no seu lugar apropriado.

NOTA: O frasco do tampão 1 é instalado para 200 injeções. Lembre-se de “resetar” o contador a cada troca.

b) Ative o System Flush (Tela “Maintain”) se os lotes forem novos.

c) Após instalação do segundo frasco de tampão 1

Siga até a tela **Lot Info**

Selecione o **Buffer 1 (5 de 8)** na tela

“Toque” o contador

Na opção **Reset Buffer**, selecione **Reset**.

7. PROCEDIMENTO DETALHADO

7.1 Procedimento de Prime em uma nova coluna

NOTA: O prime é feito uma vez a cada nova coluna.

a) Coloque o adaptador de microtubo com o código de barras “PRIME” na primeira posição da rack;
b) Certifique-se que o código de barras esta voltado para a parte de trás da rack;
c) Verta o conteúdo do prime para o microtubo de 1,5mL e coloque-o na primeira posição da rack (dentro do adaptador devidamente identificado com código de barras);
d) Coloque a rack no equipamento;
e) Selecione a tela “Run”, após o equipamento cessar os movimentos de inicialização;
f) Verifique “Prime” aparecer na (tela Run);
g) Se o código de barras “Prime” não estiver OK, digite “Prime” como identificação de amostras na posição #1 na opção Run/Edit.
h) Selecione “Start” na tela;
i) O sistema iniciará automaticamente um “flush” com Wash após o Prime estar completo. Todo processo dura 13 minutos.
j) Selecione “Eject” na tela Run para remover a rack após terminado o procedimento.

7.2 Procedimento de calibração em uma nova coluna

NOTA: A calibração é realizada uma vez a cada nova coluna.

a) Coloque os adaptadores (com seus códigos de barras) nas posições de 1 a 4 na rack de amostras: Cal1, Cal2, Low Control e High control (também já podem ser incluídos pacientes);
b) Certifique-se de que os códigos de barras estão voltados para a parte de trás da rack;
c) Pipete 1mL de cada tipo de amostras dentro dos frascos específicos;

- Calibradores na requerem pré-diluição.
- Controles requerem diluição de 1:300 com o wash.

d) Insira a rack no sistema;
e) Se o código de barras dos calibradores e controles estiverem danificados ou não forem lidos por outro motivo, manualmente escreva-os na worklist (Run/Edit screen): Cal1, Cal2, CTRL, CTRH.
f) Certifique-se de que a opção “Stop IF calibration fails” está selecionada na tela “Settings/ Alert Settings” (screen 5 of 5).
g) Selecione “Start” na tela Run;
h) O relatório de calibração será impresso após o teste ter sido executado;
i) Após o termino da corrida, selecione “Eject” na tela Run e remova a rack.

7.3 Procedimento de rotina com as amostras

a) “Passar” os controles Baixo e Alto nas posições 1 e 2 da rack;

b) Preencher os espaços remanescentes com amostras de pacientes. OBS: Amostras pré-diluídas são colocadas em adaptadores sem código de barras).

c) Insira a rack no sistema;

d) Inicialmente, código de barra são lidos;

e) No caso de algum código de barras não ter sido lido ou amostras pré-diluidas sem código de barras, entrar manualmente com os mesmos na tela “Run/Edit screen”. **Obs: O sistema não realiza o teste se a amostra não estiver identificada.**

f) Selecione “**Start”** para iniciar a corrida;

g) Ao término da corrida selecione “Eject” na tela Run para remover a rack.

NOTA: Após o término da corrida, o sistema entrará em “Standby” e permanecerá assim durante 30 minutos. Se durante este tempo não forem colocadas novas amostras, o sistema entra em Sleep.

8. CÁLCULO DE LIBERAÇÃO DOS RESULTADOS

- Não se aplica.

9. CONTROLE DE QUALIDADE

- Passar diariamente antes do início da rotina os controles 1 e 2 , próprios do equipamento, e verificar se os resultados dos controles estão válidos. Imprimir os resultados ao final da rotina e arquivar junto aos resultados dos pacientes.

10. INTERVALO DE REFERÊNCIA E VALOR CRÍTICO

Hemoglobina A_{1C}	Significado
>8	Altamente sugestivo
6 - 7	Alto risco de desenvolver Diabete
< 6	Não Diabético

11. INTERFERÊNTES

- Amostras com coágulos.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Manual de instruções BIORAD D10 Hemoglobina glicada.
2. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol.. 109: 129-135, 1971
3. Betts R.F. and al.. Journal of Infectious Diseases, 143:821-826, 1981
4. Kraat Y.J. et al.. Journal of Clin.Microbiol.. 30: 522-524, 1992.
5. Landini M.P. et al.. Eur.J.Clin.Microbiol.. 8: 159-163, 1989

HISTÓRICO DE REVISÕES

Pg.	NATUREZA DA ALTERAÇÃO	DATA REVISÃO	VERSÃO	RESPONSÁVEL